

10/525412

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/018658 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/06 (74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010554
- (22) 国際出願日: 2003年8月21日 (21.08.2003) (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 添付公開書類:  
特願2002-244280 2002年8月23日 (23.08.2002) JP ー 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 エスアールエル (SRL, INC.) [JP/JP]; 〒190-8567 東京都立川市曙町二丁目41番19号 Tokyo (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 櫻川 宜男 (SAKURAGAWA, Norio) [JP/JP]; 〒187-0032 東京都小平市小川町2-1254-25 Tokyo (JP). 内田 彩子 (UCHIDA, Saiko) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都文京区千駄木3丁目13番17-301号 Tokyo (JP).

(54) Title: HUMAN BONE STEM CELLS

(54) 発明の名称: ヒト骨幹細胞

(57) Abstract: Bone stem cells which can be stably supplied without any problem of compatibility in transplantation. These bone stem cells, which are separated from human amniotic mesenchymal cell layer, are usable in osteogenesis in a bone-lacking site and the like.

(57) 要約: 安定供給が可能であり、移植の際の適合性が問題にならない骨幹細胞が開示されている。本発明の骨幹細胞は、ヒト羊膜間葉細胞層から分離される。この骨幹細胞は、骨欠損部等における骨形成に用いることができる。

WO 2004/018658 A1

## 明細書

## ヒト骨幹細胞

## 技術分野

本発明は、ヒト羊膜から分離された、新規な骨幹細胞に関する。本発明の細胞  
5 は、これを移植することにより、骨の修復等に有用である。

## 背景技術

従来より、外傷や骨腫瘍の除去等により骨の修復が必要な場合には、患者本人  
の大腿骨等の自家骨を採取し、これを移植することが行われている。しかしなが  
ら、この方法は、患者の負担が大変大きい。一方、再生医学や組織工学の分野で  
10 は、骨細胞に分化し得る幹細胞(骨幹細胞)を移植することにより骨の修復を行  
うことが研究されている。従来より、骨幹細胞は、骨髄中や脂肪細胞層中に見出  
されている。しかしながら、これらは安定供給に難がある。また、これらの骨幹  
細胞を移植する場合には、拒絶反応を防止するために適合性を調べる必要があり、  
適合性のない患者に対しては移植ができないという問題がある。

## 発明の開示

本発明の目的は、安定供給が可能であり、移植の際の適合性が問題にならない  
骨幹細胞を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、ヒト羊膜の間葉細胞層に骨幹細胞が存在す  
ることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層から分離された骨幹細胞を提供する。  
また、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を含む骨細胞形成用  
細胞を提供する。さらに、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞  
を、骨細胞分化用培地で培養することを含む骨細胞の取得方法を提供する。さら  
に、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を、骨欠損部に移植す  
20 ることを含む、骨形成方法を提供する。さらに、本発明は、ヒト羊膜間葉細胞層  
中に存在する骨幹細胞の、骨形成のための使用を提供する。

本発明により、ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞が初めて提供された。  
本発明の骨幹細胞は、羊膜由来であるので、安定供給が可能であり、移植の際の

適合性が問題にならない。

#### 発明を実施するための最良の形態

上記の通り、本発明の細胞は、ヒト羊膜間葉細胞層から分離されるものである。間葉細胞層は、絨毛膜層と羊膜上皮細胞層との間に位置する。羊膜は、胎児由来の組織であるが、母体由来の胎盤に付着した状態で採取することができ、しかも、子宮内壁の全体を被覆する大きな組織であるので、大量に採取することができる。さらに、胎盤やそれに付着している羊膜は、医療廃棄物として処理されるものであるので、採取に倫理上の問題も生じない。

本発明の細胞は、ヒト羊膜の羊膜上皮細胞層+間葉細胞層を絨毛膜層から剥離し、これをトリプシン処理して羊膜上皮細胞を除去し、蛋白分解酵素処理することにより分離することができる。ここで、蛋白分解酵素処理の好ましい例としては、パパイン、コラゲナーゼ、中性プロテアーゼ(neutral protease)及びDNase混合液で処理することを挙げることができるが(下記実施例参照)、これに限定されるものではない。なお、蛋白分解酵素処理することにより分離される細胞には、骨幹細胞以外の細胞も含まれる。一方、細胞表面抗原を認識するモノクローナル抗体(SB-10)は骨細胞に分化する前に発現し、骨細胞に分化後に消失する(Bruder SP et al., J Bone Mineral Res 13: 655, 1998)。そこでSB-10を用いたフローサイトメトリーシステム(自動細胞解析分離装置)を用いることにより、骨幹細胞の分離、培養が可能である。なお、本発明においては、アルカリフォスファターゼを発現する細胞を骨細胞であると判断する。このような判断は、この分野において認められているものである(Jaiswal N et al., J Cell Biochem 64: 295, 1997; Pittenger MF et al., Science 284: 143, 1999)。

本発明の骨幹細胞の骨細胞への分化に用いられる骨細胞分化用培地としては、公知の骨細胞分化用培地を採用することができる。このような骨細胞分化用培地の好ましい例としては、100 nMデキサメタゾン、10 mM $\beta$ -グリセロールリン酸、0.25 mMアスコルビン酸塩(ascorbate)及び10% FBS(ウシ胎児血清)をDMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)中に含有する培地(Pittenger MF et al., Science 284:143, 1999)を挙げることができる。培養条件は、特に限定されないが、

ヒトの体温である37℃で2～4週間程度培養することが好ましい。また、培養は、5% CO<sub>2</sub>ガス雰囲気下で行うことが好ましい。

なお、上記本発明の細胞を一次培養又は継代培養をして得られる培養細胞であって、アルカリフォスファターゼを発現する細胞に分化可能な細胞も本発明の範囲に含まれる。

本発明の細胞はヒト羊膜由来であり、羊膜は胎児由来であり、免疫寛容を示す。すなわち免疫組織染色ではHLA Class I には陽性反応を呈し、HLA Class II の染色性はない。またFas ligand 陽性細胞が存在している。最近、羊膜組織が拒絶反応を惹起しにくい理由は、HLA Class Ib (HLA-G)の発現とFas ligand 陽性細胞の存在が拒絶抑制に貢献していると考えられている（眼科42:257-269, 2000）。従って、HLAの適合性を問題にすることなく移植することが可能である。

本発明の細胞は、そのまま、あるいは、アルカリフォスファターゼを発現する骨細胞にまで分化させた後、移植することにより骨の修復や再構成に用いることができる。移植する部位は、特に限定されないが、通常、骨の修復や再構成が望まれる、外傷や骨腫瘍の除去等に起因する骨欠損部である。移植は、公知の骨幹細胞移植と同様に行うことができる。移植する細胞の数は、骨欠損部の大きさや症状等に応じて適宜選択されるが、通常、 $10^3 \sim 10^7$ 個程度が適当である。

#### 実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### 1. 細胞の分離及び培養

インフォームドコンセントを得た妊婦の出産後の胎盤より、羊膜上皮細胞層＋間葉細胞層を絨毛膜層から剥離して分離した。0.125%トリプシン溶液+1.3 mM EDTAで37℃で15分間処理した。これを4回繰り返し、トリプシン溶液を遠心して細胞を集め、リン酸緩衝液（PBS）で3回洗った（トリプシン処理分画（比較例1））。消化されなかった組織塊をリン酸緩衝液で洗った後、混合酵素（0.01%パパイン、1 mg/mlコラゲナーゼ、0.01% DNase、0.1%中性プロテアーゼ）で3

7℃、1時間振盪処理を行った。1000 rpm、10分間遠心し、沈渣をPBSに浮遊させた。20  $\mu$ mフィルターに通してから、PBSで3回洗浄した（混合酵素処理分画）。

5 得られた混合酵素処理分画細胞を、100 nMデキサメタゾン、10 mM  $\beta$ -グリセロールリン酸、0.25 mMアスコルビン酸塩 (ascorbate) 及び10% FBS含有DMEM培地 (Pittenger et al., Science 284:143, 1999) 中、培養皿上で5% CO<sub>2</sub>ガス雰囲気下中で37℃で培養した。培地は3～4日後に交換した。

10 2日間培養後、市販のアルカリフォスファターゼ検出用キット (Sigma kit 85、Sigma社製) を用いて、組織学的にアルカリフォスファターゼの生産を調べた。アルカリフォスファターゼの組織学的検出は、市販のキットの添付文書通りに行った。

その結果、アルカリフォスファターゼが明瞭に検出された。これにより、本発明の細胞が、骨細胞に分化可能な骨幹細胞であることが確認された。

## 請求の範囲

1. ヒト羊膜間葉細胞層から分離された骨幹細胞。
2. ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を含む骨細胞形成用細胞。
3. ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を、骨細胞分化用培地で培養する
5. ことを含む骨細胞の取得方法。
4. ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞を、骨欠損部に移植することを  
含む、骨形成方法。
5. ヒト羊膜間葉細胞層中に存在する骨幹細胞の、骨形成のための使用。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10554

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nobuo SAKURAGAWA, "Tokushu Kansaibo Kenkyu no Shin Tenkai Chusu Shinkeikei Kansaibo", Seitai no Kagaku (1998), Vol.49, No.3, pages 196 to 202	1-6
A	SAKURAGAWA, N. et al., Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver., J Hum Genet. (2000), Vol.45, No.3, pages 171 to 176	1-6
T	Seiji TAKASHIMA et al., "Yomaku Saibo o Mochiita Saisei Iryo no Kanosei", Saisei Iryo (01 November, 2002 (01.11.02)), Vol.1, No.2, pages 79 to 85	1-6
T	Kazuchika INOUE, "Kansaibo to Saisei Iryo -Rinsho Oyo no Tenbo-", Saibo (20 October, 2002 (20.10.02)), Vol.34, No.11, pages 432 to 433	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
30 September, 2003 (30.09.03)

Date of mailing of the international search report  
14 October, 2003 (14.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.  
PCT/JP03/10554

PCT/JP03/10554

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
-----------	--	-----------------------

T	Akira IHUJI et al., "Yomaku Saibo no Saise Iryo eno Oyo", Seibutsukogaku Kaishi (25 January, 2003 (25.01.03)), Vol.81, No.1, page 22	1-6
T	Nobuo SAKURAGAWA, "Hito Yomaku Saibo Yurai no SP Saibo no Bunri, Baiyo to phenotype no Kento", Saisei Iryo -The Japanese Society for Regenerative Medicine Zasshi, special extra issue, 28 February, 2003 (28.02.03), Vol.2, page 114	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. C12N 5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. C12N 5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	桜川宣男「特集 幹細胞研究の新展開 中枢神経系幹細胞」 生体の科学 (1998) 第49巻第3号、第196-202頁	1-6
A	SAKURAGAWA, N. et al., Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. J Hum Genet. (2000) Vol. 45, No. 3, p. 171-176	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
30.09.03

国際調査報告の発送日  
14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
長井 啓子  
4N 3038  
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	高島誠司他、「羊膜細胞を用いた再生医療の可能性」 再生医療 (2002. 11. 01) 第1巻第2号、79-85頁	1-6
T	井上一知、「幹細胞と再生医療-臨床応用の展望-」 細胞 (2002. 10. 20) 第34巻第11号、第432-433頁	1-6
T	井藤彰他、「羊膜細胞の再生医療への応用」 生物工学会誌 (2003. 01. 25) 第81巻第1号、第22頁	1-6
T	桜川宣男、「ヒト羊膜細胞由来のSP細胞の分離、培養とphenotypeの検討」 再生医療-日本再生医療学会雑誌増刊号 (2003. 02. 28) 第2巻、第114頁	1-6